

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/000278

International filing date: 31 January 2005 (31.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2004-0006088
Filing date: 30 January 2004 (30.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 05 April 2005 (05.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

대한민국 특허청
KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2004-0006088
Application Number

출원년월일 : 2004년 01월 30일
Date of Application JAN 30, 2004

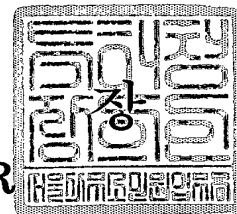
출원인 : (주)라이프코드
Applicant(s) LIFECORD INC.



2005 년 01 월 20 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.01.30
【발명의 명칭】	제대혈로부터 다분화능 전구/줄기세포를 분리 및 배양하는 방법, 및 이의 분화 유도방법
【발명의 영문명칭】	METHOD FOR ISOLATING AND CULTURING MULTIPOTENT PROGENITOR/STEM CELLS FROM UMBILICAL CORD BLOOD AND METHOD FOR INDUCING DIFFERENTIATION THEREOF
【출원인】	
【명칭】	(주)라이프코드
【출원인코드】	1-2001-011424-5
【대리인】	
【성명】	이현실
【대리인코드】	9-1999-000366-5
【포괄위임등록번호】	2001-016823-5
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	2001-016819-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이명우
【성명의 영문표기】	LEE, Myoung Woo
【주민등록번호】	770201-1168346
【우편번호】	420-011
【주소】	경기도 부천시 원미구 심곡1동 75-4 2층
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김영진
【성명의 영문표기】	KIM, Young Jin
【주민등록번호】	591024-1000218

【우편번호】	137-948
【주소】	서울특별시 서초구 잠원동 동아아파트 102동 2004호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	최정은
【성명의 영문표기】	CHOI, Jeong Eun
【주민등록번호】	620820-2051711
【우편번호】	463-958
【주소】	경기도 성남시 분당구 정자동 28-1 로얄팰리스 B-2403
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	양말숙
【성명의 영문표기】	YANG, Mal Sook
【주민등록번호】	730314-2675011
【우편번호】	440-722
【주소】	경기도 수원시 장안구 정자동 886-1 두견마을 벽산아파트 336동 1804 호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	문영준
【성명의 영문표기】	MOON, Young Joon
【주민등록번호】	760601-1058111
【우편번호】	152-059
【주소】	서울특별시 구로구 구로본동 480-23
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김선경
【성명의 영문표기】	KIM, Sun Kyung
【주민등록번호】	750825-2079511
【우편번호】	445-986
【주소】	경기도 화성시 태안읍 병점리 두산아파트 107동 1202호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김호철

【성명의 영문표기】 KIM, Hugh C.

【주소】 경기도 수원시 팔달구 인계동 1122-10 삼호타워 1504

【국적】 US

【발명자】

【성명의 국문표기】 박준성

【성명의 영문표기】 PARK, Jun Seong

【주민등록번호】 651017-1025611

【우편번호】 442-757

【주소】 경기도 수원시 팔달구 원천동 원천주공아파트 104동 805호

【국적】 KR

【심사청구】 청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 26

【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
이현실 (인) 대리인
장성구 (인)

【수수료】

【기본출원료】 40 면 38,000 원

【가산출원료】 0 면 0 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 18 항 685,000 원

【합계】 723,000 원

【감면사유】 중소기업

【감면후 수수료】 361,500 원

【요약서】

【요약】

본 발명은 제대혈 유래 단핵구로부터 다분화능 전구/줄기세포 (multipotent progenitor/stem cell)를 분리 및 배양하는 방법, 및 분리된 다분화능 전구/줄기세포를 조직세포로 분화시키는 방법에 관한 것으로, 구체적으로 제대혈 유래 단핵구를 통상적인 세포배양용 배지에 과립구-대식세포 콜로니 자극인자 (granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF)를 추가로 포함하는 1차 세포배양배지; 상기 1차 세포배양배지에서 GM-CSF가 결핍된 2차 세포배양배지; 및 통상적인 세포배양용 배지에 덱사메타손 (dexamethasone), 줄기세포인자 (stem cell factor; SCF), 염기성 섬유아세포 성장인자 (basic-fibroblast growth factor; bFGF) 및 상피세포 성장인자 (epidermal growth factor; EGF)를 추가로 포함하는 3차 세포배양배지에 순차적으로 단층 배양하는 단계를 포함하는, 제대혈 유래 단핵구로부터 다분화능 전구/줄기세포를 분리 및 배양하는 방법 및, 상기 전구/줄기세포를 신경세포, 골모세포 및 내피세포 등의 다양한 조직세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 의해 제대혈 유래 단핵구로부터 얻어진 다분화능 전구/줄기세포는 대량생산이 가능하고 다양한 조직세포로의 분화가 효율적으로 유도되므로, 세포요법 (cell therapy), 세포대체요법 (cell replacement therapy), 장기복원술, 장기생산 등에 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 1

【명세서】

【발명의 명칭】

제대혈로부터 다분화능 전구/줄기세포를 분리 및 배양하는 방법, 및 이의 분화 유도방법
{METHOD FOR ISOLATING AND CULTURING MULTIPOTENT PROGENITOR/STEM CELLS FROM UMBILICAL CORD
BLOOD AND METHOD FOR INDUCING DIFFERENTIATION THEREOF}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 단핵구로부터 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포를 현미경으로 관찰한 것이고,

a: 배양 1주,

b: 배양 2주

c: 배양 3주,

d: 배양 4주 (다분화능 전구/줄기세포)

도 2는 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 단핵구로부터 분리되어 12주까지 배양된 다분화능 전구/줄기세포의 세포수를 측정한 것이고,

A: 3차 배양배지 + GM-CSF 400 ng/ml

B: 3차 배양배지

도 3은 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 단핵구로부터 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포의 면역표현형을 유세포분석기로 분석한 결과이고,

a: CD14,

b: CD31

c: CD45,

d: CD34

e: CD73,

f: CD105

g: CD166

도 4는 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 단핵구로부터 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포의 신경세포로의 분화를 현미경으로 관찰한 결과이고,

a: 대조군,

b: 배양 3일

c: 배양 1주,

d: 배양 2주

도 5는 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 단핵구로부터 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포가 신경세포로 분화되는지를 확인하기 위하여 신경세포 특이적인 표지 유전자를 대상으로 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행한 결과이고,

M: 분자량 마커,

레인 1: 대조군-신경세포주

레인 2; 실험군-제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포에서 분화유도된 신경세포

도 6은 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 단핵구로부터 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포가 신경세포의 일종인 신경교세포 (glial cell)로 분화되는지를 확인하기 위하여 성상세포 (astrocyte; 신경교세포의 일종) 특이적인 표지 유전자 GFAP를 대상으로 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행한 결과이고,

M: 분자량 마커,

레인 1: 대조군-신경세포주

레인 2; 실험군-제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포에서 분화유도된 신경세포

도 7은 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 단핵구로부터 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포가 골모세포로 분화되는지를 확인하기 위하여 알카라인 포스파타제 (alkaline phosphatase) 염색 후 현미경으로 관찰한 결과이고,

A : 미분화유도 세포,

B : 제대혈 유래 골모세포

도 8은 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 단핵구로부터 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포가 골모세포로 분화되는지를 확인하기 위하여 골모세포 특이적인 표지 유전자를 대상으로 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행한 결과이고,

A: 알칼라인 포스파타아제, B: 타입 I 프로콜라겐
M: 분자량 마커, 1: 골수 유래 골모세포
2 : 미분화유도 세포, 3: 제대혈 유래 골모세포3

도 9는 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 단핵구로부터 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포가 내피세포로 분화되는지를 확인하기 위하여 ac-LDL 처리 후 현미경으로 관찰한 결과이고,

도 10은 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 단핵구로부터 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포가 내피세포로 분화되는지를 확인하기 위하여 내피세포 특이적인 표지 유전자를 대상으로 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행한 결과이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<29> 본 발명은 제대혈 유래 단핵구로부터 다분화능 전구/줄기세포 (multipotent progenitor/stem cell)를 분리하여 배양하는 방법 및 이들을 다양한 조직세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다.

- <30> 줄기세포란 각각의 인체 조직을 구성하는 세포로 분화되기 전단계의 세포로서, 미분화 상태에서 무한 증식능력 (self-renewal capacity)을 가지며, 특정한 분화유도자극에 의하여 각기 다른 다양한 조직의 세포로 분화될 수 있는 (trans-differentiation) 능력을 가지고 있다.
- <31> 줄기세포는 분화능 (differentiation capacity)과 생성시기에 따라 크게 배아줄기세포 (embryonal stem cell; ES cell)와 성체줄기세포 (adult stem cell)로 나눌 수 있다. 배아줄기세포는 수정란의 형성 후 자궁내막에 착상하기 전의 초기단계인 포배기 (blastocyst) 배아 중 태아로 발생할 세포괴 (inner cell mass)로부터 분리할 수 있다. 상기 세포는 내배엽, 외배엽 및 중배엽의 3가지 배엽으로부터 생성되고 인체 대부분의 특이적 조직세포로 분화될 수 있는 잠재력을 가지고 있으나, 이를 얻는데 윤리적인 문제가 따르고 배아줄기세포의 분화능을 조절하는 것 역시 해결해야할 과제로 남아 있다.
- <32> 반면, 성체줄기세포는 배아상태가 아닌, 발생과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체단계에서 나타나는 줄기세포로서, 그 분화능이 일반적으로 특정 조직을 구성하는 세포로만 한정된다. 이러한 성체줄기세포는 성인이 된 후에도 대부분의 장기에 남아 정상적으로 혹은 병리적으로 발생하는 세포의 손실을 보충하는 역할을 담당한다.
- <33> 대표적인 성체줄기세포에는 조혈모세포 (hematopoietic stem cells; HSCs)와 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cells; MSCs)가 있다. 조혈모세포는 적혈구, 백혈구, 혈소판 등 주로 혈액내의 혈구세포로 분화하는 반면, 중간엽 줄기세포는 골모세포 (osteoblast), 연골모세포 (chondroblast), 지방세포 (adipocyte) 및 근아세포 (myoblast) 등으로 분화한다.
- <34> 상기한 배아줄기세포 혹은 성체줄기세포의 분리 및 배양방법이 알려지면서 세포 치료제로서의 임상적 적용에 관심이 고조되고 있다. 현재 임상에서는 파킨슨씨병, 알츠하이머 병과 같은 신경퇴행성 질환이나 척추 손상에 의한 사지마비, 백혈병, 중풍, 소아 당뇨병, 심근경색,

간경화 혹은 암, 기타 만성질환 등으로 인해 손상된 조직과 장기를 치료하기 위해서 약물 및 수술과 같은 치료가 주류를 이루고 있으나, 상기한 줄기세포를 이용하여 이들 질환에 의해 파괴되어 부족한 세포를 외부로부터 공급해주는 세포대체요법 (cell replacement therapy)이 부작용을 최소화하면서 최대한의 치료효과를 기대할 수 있는 효과적인 치료법으로 제시되어 수많은 연구가 진행되고 있다.

<35> 성체줄기세포를 얻을 수 있는 대표적인 조직으로 골수가 알려져 있는데, 골수에는 조혈 줄기세포, 중간엽 줄기세포, 다분화능 성체 전구세포 (multipotent adult progenitor cells; MAPCs), 간 줄기세포 (hepatic stem cell) 등이 존재하고 있다. 특히, 최근 알려진 골수유래 다분화능 성체 전구세포는 현재까지 알려진 중간엽 줄기세포와 같이 골모세포, 연골모세포, 지방세포 등으로 분화할 뿐만 아니라 신경세포, 내피세포, 간세포 등 다른 조직세포로도 분화가 가능하다는 연구가 발표되어 수많은 관심을 끌고 있다 (Reyes M, et al., *Blood* 98: 2615-2625, 2001; Reyes M, et al., *J. Clin. Invest.* 109: 337-346, 2002). 그러나, 골수에서 세포를 얻기 위해서는 여러 단계의 기술이 필요하고, 기술 과정이 복잡하여 채취 대상자에게 시간적, 정신적 및 육체적 고통을 수반하는 것이 보통이다. 또한, 골수 이식을 위해서는 조직적합항원 비교를 통해 항원 표현형이 일치하여 이식편대숙주반응을 보이지 않는 공여자를 찾아야 한다는 상당히 어려운 문제점이 있다.

<36> 상기한 성체줄기세포중 골수에 존재하는 중간엽 줄기세포는 1976년 프리덴스타인 등에 의해 처음 보고된 이후 그 분화능과 세포 치료제로서의 가능성에 대해 수많은 연구가 이루어져 왔다 (Friedenstein AJ,

Int. Rev. Cytol. 47: 327-345, 1976). 특히, 연골질환의 경우 현재 임상단계에의 응용이 거의 상용화된 상태이며, 골세포 치료제로서의 기능도 임상단계 진입을 눈앞에 두고 있다. 그러나, 골수에 존재하는 중간엽 줄기세포는 한정된 분화능과 줄기세포의 특성 중 한가지인 제한된 증식능력으로 인해 그 응용범위가 한정될 수밖에 없으며, 골수유래라는 한계로 인해 상기한 골수유래 세포를 얻는데 문제가 되는 점들을 모두 내포하고 있다. 또한, 최근 알려진 골수유래 다분화능 성체 전구세포의 경우도 분화능의 측면에서 넓은 사용범위 (신경세포, 간세포, 내피세포 등)를 가지고는 있으나, 골수유래라는 한계점으로 인해 그 분리 및 배양에 어려움이 있다.

<37> 이외에 최근 각광받고 있는 제대혈도 줄기세포의 원천으로서 많은 연구가 이루어지고 있다. 제대혈이 조혈모세포의 풍부한 원천으로 알려진 이후, 임상적으로 제대혈 이식을 통해 혈액 관련 질환을 치료하고자 하는 시도가 활발히 이루어지고 있으며, 자가이식 치료를 위하여 제대혈을 냉동시켜 수년 후 사용가능한 상태로 보존하는 제대혈 은행이 국내에도 활성화되어 있는 실정이다.

<38> 제대혈은 골수와는 달리 분만과정에서 주로 버려지는 제대에서 간단한 시술을 통해 얻을 수 있으며, 그 양에 비해 수많은 조혈모세포 및 줄기세포를 포함하고 있다. 또한, 제대혈 이식시 나타날 수 있는 이식편대숙주반응이 골수 이식에 비해 상당히 적어 제대혈에 포함되어 있는 줄기세포의 성상 및 그 임상에의 응용 확대를 위한 연구가 전 세계적으로 이루어지고 있다.

<39> 그러나, 제대혈에 존재하는 중간엽 줄기세포 (Erices A, et al.,

Br. J. Haematol. 109: 235-242, 2000) 혹은 다분화능 전구/줄기세포 (Lee OK, et al., *Blood* 1st Ed. Paper, prepublished online October 23, 2003; DOI 10.1182/blood-2003-05-1670)를 찾기 위한 연구는 그 존재에 대한 논란의 소지가 여전히 제기되고 있으며 (Wexler SA, et al., *Br. J. Haematol.* 121: 368-74, 2003), 국내외적으로 모두 제대혈 유래 세포의 분화능에 대한 검증이 제대로 이루어지지 않아 어려움이 많다. 뿐만 아니라, 골모세포, 연골모세포, 지방세포, 신경세포, 내피세포 등 다양한 조직세포로의 분화유도가 가능한 줄기세포를 제대혈에서 분리 및 배양하는 방법은 현재까지 명확히 알려진 바가 거의 없다.

<40> 이에 본 발명자들은 세포요법, 세포대체요법, 장기복원술, 장기생산 등에 유용하게 사용될 수 있는 다분화능 전구/줄기세포를 효과적으로 얻을 수 있는 방법을 예의 연구한 결과, 제대혈로부터 분리한 단핵구로부터 골모세포, 연골모세포, 지방세포, 신경세포, 내피세포 등으로 분화가능한 다분화능 전구/줄기세포를 분리 및 배양하는 방법과 이들을 다양한 조직세포로 분화시킬 수 있는 분화 유도방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<41> 본 발명의 목적은 제대혈 유래 단핵구로부터 다분화능 전구/줄기세포를 효율적으로 분리하여 배양하는 방법과 상기의 세포를 다양한 조직세포로 분화 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

- <42> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 제대혈 유래 단핵구를 일련의 고농도 포도당 배지에서 순차적으로 단층 배양하여 다분화능 전구/줄기세포를 분리 및 배양하는 방법 및 이를 위한 배지 조성물을 제공한다.
- <43> 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포를 다양한 조직세포로 분화 유도하는 방법 및 이를 위한 배지 조성물을 제공한다.
- <44> 아울러, 본 발명은 상기 방법에 의해 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화된 다양한 조직세포를 유효성분으로 포함하는 세포요법용 조성물을 제공한다.
- <45> 제대혈 유래 단핵구로부터 다분화능 전구/줄기세포를 분리 및 배양하는 본 발명의 방법은 제대혈 유래 단핵구를 통상적인 세포배양용 배지에 과립구-대식세포 콜로니 자극인자 (granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF)를 추가로 포함하는 1차 세포배양배지; 상기 1차 세포배양배지에서 GM-CSF가 결핍된 2차 세포배양배지; 및 통상적인 세포배양용 배지에 덱사메타손 (dexamethasone), 줄기세포인자 (stem cell factor; SCF), 염기성 섬유아세포 성장인자 (basic-fibroblast growth factor; bFGF) 및 상피세포 성장인자 (epidermal growth factor; EGF)를 추가로 포함하는 3차 세포배양배지에 순차적으로 단층 배양하는 단계를 포함하는 단계를 포함한다.
- <46> 제대혈은 인간을 포함한 포유동물에서 태반과 태아를 연결하는 제대정맥으로부터 채취한 혈액으로 분만 후 태반이 박리되기 전에 채취하며, 본 발명에서는 인간의 제대혈을 사용하는 것이 바람직하다.

- <47> 제대혈로부터 단핵구를 분리하기 위해서는 피콜-하이팩 밀도구배 분리법 (Ficoll-Hypaque density gradient method)과 같은 공지의 방법을 사용할 수 있다.
- <48> 구체적으로, 분만 후 태반이 박리되기 전에 채취한 제대혈을 인산염 완충용액 (phosphate buffered saline, PBS)과 혼합하여 희석한 후, 희석된 제대혈과 동량의 피콜-하이팩 용액 (Ficoll-Hypaque, 밀도; 1.077 g/ml)에 중첩시킨다. 이때, 피콜-하이팩 용액은 사용 전에 실온이 되도록 하며, 희석된 제대혈의 부피가 피콜-하이팩 용액 부피의 3배가 넘지 않도록 하는 것이 바람직하다. 이를 2,000 rpm의 속도로 상온에서 30분간 원심분리하여 적혈구층과, 단핵구층 및 혈청층을 분리한다. 파스퇴르 피펫 (pasteur pipette) 등을 이용하여 단핵구층만을 새로운 튜브로 옮기고 PBS 등으로 세척하여 단핵구층 채취시 혼입된 피콜-하이팩 용액이나 오염된 혈소판을 제거한다.
- <49> 이와 같이 분리된 단핵구는 바로 다분화능 전구/줄기세포 분리 및 배양에 이용하거나 초저온 냉동시켜 장기간 보관할 수 있다.
- <50> 상기와 같이 분리된 제대혈 유래 단핵구로부터 다분화능 전구/줄기세포를 분리 및 배양하기 위해, 단핵구를 1차, 2차 및 3차 세포배양배지에서 순차적으로 단층 배양한다. 본 발명에서, 세포배양배지는 RPMI1640, α -MEM, IMDM, DMEM과 같은 통상적인 세포배양용 배지, 바람직하게는 DMEM을 기본으로 하고 각 배양 목적에 따라 필요한 성분을 첨가하여 사용할 수 있다. 또한, 상기의 통상적인 세포배양용 배지에 3,500 내지 5,500 mg/ml D-글루코오스와 50 내지 200 mg/ml 피루브산염 나트륨을 포함하는 고농도 포도당 (high glucose) 배지를 기본으로 하고 각 배양 목적에 따라 필요한 성분을 첨가하여 사용할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 DMEM 배지에 4,500 mg/ml D-글루코오스와 110 mg/ml 피루브산염 나트륨이 추가로 포함된 고농도 포도당 배지인 HG-DMEM (Gibco cat. No. 12800-017)을 사용한다.

- <51> 먼저, 1차 배양은 제대혈로부터 바로 분리된 신선한 단핵구 또는 초저온 냉동보관되어 있던 단핵구를 해동시킨 것을 1차 배양배지에 0.1 내지 1×10^6 세포/ cm^2 의 농도로 접종하여 5 내지 10일 간격으로 신선한 배지로 교체해 주면서 1 내지 2주간 5% 이산화탄소 배양기에서 37℃의 온도로 배양한다. 이때, 1차 배양배지는 10 내지 20% 소 태아 혈청 (Fetal Bovine Serum; FBS), 0.5 내지 2 mM 피루브산염 나트륨 (sodium pyruvate), 1 내지 5 mM L-글루타민, 1×페니실린/스트렙토마이신 및 10 내지 100 ng/ml GM-CSF를 추가로 포함하는 고농도 포도당 (high glucose) 세포배양배지가 바람직하다.
- <52> 세포군집 (colony) 형성이 확인되면 1차 배양배지를 2차 배양배지로 바꾸어 주는데, 2차 배양배지는 1차 배양배지에서 GM-CSF가 결핍된 세포배양배지로 10 내지 20% FBS, 0.5 내지 2 mM 피루브산염 나트륨, 1 내지 5 mM L-글루타민 및 1×페니실린/스트렙토마이신을 포함한다. 2차 배양은 상기 1차 배양에 연이어 1차 배양된 세포의 배지를 2차 배양배지로 바꾸어주고 1 내지 2주간 5% 이산화탄소 배양기에서 37℃의 온도로 배양하는데, 이때 5 내지 10일 간격으로 신선한 배지를 공급해준다.
- <53> 마지막으로 3차 배양은 증식배양으로서, 2차 배양 후 콜로니를 형성한 세포들이 80 내지 90% 유착하여 자라게 되면 배지 제거, PBS 세척, 트립신/EDTA 용액 처리 등의 과정을 거친 후 이로부터 얻은 2 내지 8×10^4 세포/ cm^2 의 세포를 3차 배양배지에 접종하여 3 내지 5일 간격으로 신선한 배지로 교체하면서 1 내지 2주간 5% 이산화탄소 배양기에서 37℃의 온도로 배양하여 다분화능 전구/줄기세포로의 성장 및 증식을 유도한다. 이때, 3차 배양배지는 10 내지 20% FBS, 0.5 내지 2 mM 피루브산염 나트륨, 1 내지 5 mM L-글루타민, 1×페니실린/스트렙토마이신, 10^{-8} 내지 10^{-7} M 덱사메타손 (dexamethasone), 10 내지 100 mg/ml 줄기세포인자 (stem cell factor; SCF), 10 내지 50 mg/ml 염기성 섬유아세포 성장인자 (basic-fibroblast growth

factor; bFGF), 및 10 내지 50 mg/ml 상피세포 성장인자 (epidermal growth factor; EGF)를 포함하는 고농도 포도당 세포배양배지가 바람직하다.

<54> 상기와 같은 단계에 의해 제대혈 유래 단핵구로부터 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기 세포를 현미경으로 관찰한 결과, 방추형의 세포체를 갖는 섬유아세포-유사 세포 (fibroblast-like cell with spindle shaped cell body)의 특징을 나타내었다 (도 1 및 2 참조). 또한, 유세포분석기로 면역표현형을 분석한 결과, 단핵구 항원 (monocyte marker)인 CD14, 내피 전구 항원 (endoglin; endothelial progenitor marker)인 CD31, 및 백혈구 관련 항원 (Leukocyte common marker)인 CD45에 대한 항체에는 양성반응을 나타내며, 조혈모세포 관련 항원 (hematopoietic stem cells marker)인 CD34, 중간엽 줄기세포 항원인 CD73 (SH3, SH4; mesenchymal stem cell marker), CD105 (SH2; mesenchymal stem cell marker), 및 세포부착 관련 항원인 CD166 (ALCAM; adhesion molecule)에 대한 항체에는 음성반응을 나타냄을 알 수 있다 (도 3 참조). 실험결과 양성반응을 보이는 CD14, CD31 및 CD45 항원은 조혈 줄기세포에서 유래하여 분화된 혈구계통의 세포에서 발현한다고 알려져 있는 세포표면항원이고, 음성반응을 보이는 CD34 항원은 조혈모세포 특이 항원, CD73, CD105 및 CD166 항원은 중간엽 줄기세포 특이 항원이다. 즉, 상기 면역표현형 분석결과로부터, 본 발명의 다분화능 전구/줄기세포가 조혈계통 세포이며, 조혈모세포 혹은 중간엽 줄기세포와는 다른 세포임을 알 수 있다.

<55> 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포를 다양한 조직세포로 분화시키는 방법 및 이를 위한 배지 조성물을 제공한다.

<56> 본 발명의 방법에 따라 다분화능 전구/줄기세포를 특정한 조성의 배지에서 특정한 조건으로 배양하여 다양한 조직세포, 예를 들면 신경세포, 골모세포 및 내피세포로 분화시킬 수 있다.

<57> 먼저, 다분화능 전구/줄기세포를 신경세포로 분화시키기 위한 배지는 0.1 내지 2% FBS, 0.5 내지 2 mM 피루브산염 나트륨, 1 내지 5 mM L-글루타민, 1×페니실린/스트렙토마이신, 1 내지 25 μ M 레티노산 (retinoic acid), 1 내지 20 μ M 폴스콜린 (Folskolin), 10 내지 100 ng/ml 신경 성장인자 (nerve growth factor; NGF), 0.00001 내지 0.0001% 베타-머캅토에탄올 (beta-mercaptoethanol)을 포함하는 고농도 포도당 배지가 바람직하며, 상기 분화유도배지에 다분화능 전구/줄기세포를 2 내지 8×10^4 세포/ cm^2 의 농도로 접종하여 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 1 내지 2주간 배양한다.

<58> 본 발명의 바람직한 실시예에서, 상기와 같이 배양된 세포를 현미경과 역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR)으로 조사한 결과, 신경세포의 현미경적 특성인 신경세포 돌기가 잘 뻗어져 있는 전형적인 신경세포의 모습을 나타내었고 (도 4 참조), 신경세포에서 특이적으로 발현한다고 알려진 네스틴, 뉴로필라멘트, 비멘틴, 속스-1, 속스-2, 뉴로-D, GFAP 및 GAPDH 유전자의 발현이 검출되어 본 발명의 방법에 따라 다분화능 전구/줄기세포가 신경세포로 분화 유도되었음을 확인하였다 (도 5 및 6 참조).

<59> 또한, 다분화능 전구/줄기세포를 골모세포로 분화시키기 위한 배지는 5 내지 20% FBS, 1×페니실린/스트렙토마이신, 0.1 내지 1 μ M 덱사메타손, 10 내지 100 μ M 2-인산 아스코르브산 및 5 내지 20 mM 베타-글리세로포스페이트를 포함하는 고농도 포도당 배지가 바람직하고, 상기 분화유도배지에 다분화능 전구/줄기세포를 0.5 내지 2×10^5 세포/ cm^2 의 농도로 접종하여 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 2 내지 3주간 배양한다. 이때, 배지는 3 내지 4일에 한번씩 새 것으로 교체해 준다.

- <60> 본 발명의 바람직한 실시예에서, 골모세포로의 분화를 확인하기 위하여 알칼라인 포스파타아제 (alkaline phosphatase, ALP)로 염색한 후 현미경으로 관찰한 결과, 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화가 유도된 골모세포에서만 ALP가 염색됨을 확인하였다 (도 7 참조). 또한, 골모세포에서 특이적으로 발현한다고 알려진 유전자를 대상으로 RT-PCR을 수행한 결과, 본 발명의 제대혈 유래 골모세포에서 알칼라인 포스파타아제 및 타입 I 프로콜라겐 유전자의 발현이 검출되어 다분화능 전구/줄기세포의 골모세포로의 분화가 효과적으로 유도되었음을 확인하였다 (도 8 참조).
- <61> 또한, 다분화능 전구/줄기세포를 내피세포로 분화시키기 위한 배지는 0.1 내지 2% FBS 및 1×페니실린/스트렙토마이신 및 10 내지 100 ng/ml VEGF를 포함하는 고농도 포도당 배지가 바람직하고, 상기 분화유도배지에 다분화능 전구/줄기세포를 0.2 내지 0.4×10^5 세포/cm²의 농도로 접종하여 5% 이산화탄소, 37℃ 배양기에서 2 내지 3주간 배양한다. 이때, 배지는 3 내지 4일에 한번씩 새 것으로 교체해 준다.
- <62> 본 발명의 바람직한 실시예에서, 내피세포로의 분화를 확인하기 위하여 형광현미경으로 ac-LDL 섭취능을 관찰한 결과, 대부분의 세포가 ac-LDL을 섭취하여 붉은 색으로 염색됨을 확인되었다 (도 9 참조). 또한, 내피세포에서 특이적으로 발현한다고 알려진 유전자를 대상으로 RT-PCR을 수행한 결과, Flt-1/VEGFR-1, VE-카드헤린, vWF (von Willebrand factor) 유전자의 발현이 검출되어 본 발명의 방법에 따라 다분화능 전구/줄기세포가 내피세포로 분화되었음을 확인하였다 (도 10 참조).
- <63> 아울러, 본 발명은 상기 방법에 의해 제대혈 유래 단핵구로부터 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포 또는 이로부터 분화된 다양한 조직세포를 유효성분으로 포함하는 세포요법용 조성물을 제공한다.



<64> 본 발명에 있어서, 다분화능 전구/줄기세포 또는 이로부터 분화된 조직세포는 임의의 투여경로에 의해서, 구체적으로는 복강내 투여, 피하 투여, 정맥 또는 동맥 혈관내 투여, 주사에 의한 국소 투여 등의 방법에 의해서 투여가능하다. 또한, 인간의 경우에는, 정맥내 투여, 동맥내 투여, 주사에 의한 국소 투여, 복강 또는 흉강 투여, 피하 투여, 근육내 투여 등에 의해 투여할 수 있으며, 정맥내 투여가 가장 바람직하다.

<65> 본 발명에 있어서, 다분화능 전구/줄기세포 또는 이로부터 분화된 조직세포는 통상의 방법에 기초하여 주사제, 현탁제, 유화제 등의 형태로 투여할 수 있고, 필요에 따라서 프로인트 완전 보조제 등의 보조제에 현탁되거나 또는 BCG와 같은 보조제 활성을 갖는 물질과 함께 투여하는 것도 가능하다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명에 의한 세포요법용 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체나 첨가제를 함유할 수 있는데, 유효 성분 이외에 희석제 (예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제 (예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리 에틸렌 글리콜), 결합제 (예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가 칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘), 붕해제 (예: 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유할 수 있다.

<66> 본 발명에 의한 조성물에 있어서 각 유효성분은, 개개의 상황에 따라서 연속적 또는 간헐적으로 투여할 수 있다. 구체적인 투여량은 투여방법, 연령, 체중, 성별, 감수성, 투여시간, 병용 약제 등과 같은 환자의 제조건에 따라 변화될 수 있으며, 하루에 유효성분으로

서 0.5 내지 20×10^6 세포/kg 체중, 바람직하게는 1 내지 10×10^6 세포/kg 체중을 1회 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 다분화능 전구/줄기세포 또는 이로부터 분화된 조직세포는 주사제로 하는 것이 바람직하고, 미리 소정 농도로 조절된 것을 그대로 투여하거나 투여 직전에 주사용 생리식염수 등으로 소정농도로 희석해서 투여할 수 있다.

<67> 본 발명에 따라 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화된 다양한 조직세포, 예를 들면 신경세포, 골모세포, 내피세포 등은 뇌졸중, 척수질환, 파킨슨씨병, 알츠하이머병, 간질, 뇌종양 등의 각종 난치성 중추 신경계 질환의 치료뿐만 아니라 근육질환, 심장근질환, 간질환, 당뇨병, 혈액질환, 골세포 및 연골세포 치료와 손상된 조직의 재생공학적 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

<68> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<69> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<70> <실시예 1> 제대혈 유래 단핵구로부터 다분화능 전구/줄기세포의 분리 및 배양

<71> 제대혈은 분만 후 태반이 박리되기 전에 자궁수축을 이용하여 제대정맥으로부터 60 내지 150 ml를 채취하는데, 제대혈 채취백 (bag, 175 ml, 항응고제 CPDA-1 23 ml 포함)을 이용하거나 헤파린 5 ml를 포함하는 50 ml 주사기를 이용하여 채취하였다. 제대혈 채취시 이용되는 모든 기구는 무균 처리된 것을 사용하였으며, 제대혈 채취 전에 소독용 알코올 또는 베타딘으로 채취부위를 소독하였다.

- <72> 제대혈로부터 단핵구를 분리하기 위하여, 50 ml 코니칼 튜브에 채취 후 24시간 이내의 제대혈 15 ml을 분주한 후 15 ml의 인산염 완충용액 (Dulbecco's PBS; Hyclone, SH300028.03)을 첨가하여 혼합하였다. 상기 코니칼 튜브의 하단에 피콜-하이팩 (Ficoll-Hypaque, Sigma, H8887, 밀도; 1.077 g/ml) 15 ml을 천천히 중첩시킨 후, 2,000 rpm의 속도로 상온에서 30분간 원심분리하여 하단의 적혈구층, 중간층의 단핵구층 및 상층의 혈청층의 순서로 분리하였다. 이 중, 단핵구층만을 파스퇴르 피펫을 이용하여 새로운 튜브로 옮기고 PBS 20 ml을 첨가하여 잘 혼합한 후 2,000 rpm의 속도로 상온에서 10분간 원심분리하여 세척하였다. 그 후 상층액을 제거하고, 단핵구 침전물에 다시 40 ml의 PBS를 처리하여 부유시킨 뒤 단핵구의 생존도 및 세포수를 측정하여 상온에서 2,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다.
- <73> 상기의 과정을 거쳐 얻은 단핵구 세포 침전물을 곧바로 기본배지에 부유시켜 다분화능 전구/줄기세포의 분리 및 배양에 사용하거나, 초저온 냉동시켜 보관하였다.
- <74> 초저온 냉동보관을 위해, 상기의 단핵구 침전물을 10% DMSO (dimethyl sulfoxide)를 포함하는 자가혈청에 부유시킨 후 2 ml 냉동튜브에 1.5 내지 2×10^7 세포 농도로 분주하였다. 상기 튜브를 오염방지 포장한 후 자동조절 냉동기 (program-controlled freezer)에서 -100°C 까지 온도를 낮추어 냉동시키고 액체 질소가 들어있는 초저온 냉동보관 탱크에 보존하였다.
- <75> 초저온 냉동보관된 단핵구를 사용하는 경우에는, 단핵구가 적재된 냉동튜브를 37°C 항온수조에서 급격하게 해동시킨 후 이를 코니칼 튜브에 옮기고 10배 부피의 10% BSA가 포함된 기본배지를 처리하였다. 상기 튜브를 상온에서 2,000 rpm의 속도로 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 제거하고 얻은 세포 침전물을 이후의 다분화능 전구/줄기세포 분리 및 배양과정에 사용하였다.

<76> T25 세포배양 플라스크에 1차 배양배지 (10% FBS, 110 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 피루브산염 나트륨, 2 mM L-글루타민, 1×페니실린/스트렙토마이신 및 10 ng/ml GM-CSF를 포함하는 HG-DMEM 배지 (Gibco, cat. No. 12800-017)) 6 ml을 넣은 후 상기와 같이 준비된 제대혈 유래 단핵구를 1×10^6 세포/ cm^2 의 농도로 접종하였다. 이를 5% 이산화탄소와 37°C 온도가 유지되는 세포 배양기에 넣어 1주간 단층 배양하였다. 그 후 콜로니 형성이 확인되면 1차 배양배지를 2차 배양배지 (10% FBS, 110 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 피루브산염 나트륨, 2 mM L-글루타민 및 1×페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 HG-DMEM 배지)로 교체하여 2주간 다시 배양하였고 매일 배양용기의 배양면에 부착하여 자라는 콜로니의 형성 및 세포들을 관찰하였다. 그 후 콜로니를 형성한 세포들이 80 내지 90% 유착하여 자라게 되면 세포의 증식을 위해 2차 배양배지를 제거하고, PBS로 세척한 후 0.25% 트립신/EDTA 용액을 처리하였다. 상기 과정을 거쳐 얻은 세포를 새로운 T25 배양 플라스크에 0.5 내지 2×10^6 세포/ cm^2 농도로 접종하고 3차 배양배지로 교체하여 1주간 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 배양하였다. 이때, 3차 배양배지로는 10% FBS, 110 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 피루브산염 나트륨, 2 mM L-글루타민, 1×페니실린/스트렙토마이신, 덱사메타손 10^{-8} M, 10 mg/ml 농도의 줄기세포인자, 염기성 섬유아세포 성장인자 및 상피세포 성장인자를 포함하는 HG-DMEM 배지를 사용하였다.

<77> 도 1은 상기 방법에 따라 제대혈 유래 단핵구로부터 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포를 현미경으로 관찰한 것으로, 방추형 세포체를 갖는 섬유아세포-유사 세포 (fibroblast-like cell with spindle shaped cell body)의 특징을 확인할 수 있다. 또한, 도 2는 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 단핵구로부터 분리되어 12주까지 배양된 다분화능 전구/줄기세포의 세포수를 측정한 것으로, 세포가 효율적으로 증식됨을 확인하였다. 상기 결과로부터 배양 초기에는 다분화능 전구/줄기세포의 높은 증식률을 유도하는 GM-CSF가 지속적으로

처리되는 경우에는 세포 모양의 변화 및 세포의 분화를 유도하기 때문에 3차 배양배지에는 GM-CSF를 포함시키지 않는 것이 바람직함을 알 수 있다.

<78> <실시예 2> 제대혈 유래 단핵구로부터 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포의 특성 분석

<79> 상기 실시예 1에서 제대혈 유래 단핵구로부터 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포의 면역표현형 (immunotyping)을 분석하기 위하여, 배양된 세포에 0.05% 트립신/EDTA를 처리하여 배양용기로부터 분리시킨 후 PBS로 2번 세척하였다. 세포를 5×10^5 세포/200 μ l의 농도로 PBS에 부유시킨 후 각 항체를 10 μ l씩 첨가하고 15분간 암실에서 반응시켰다. 그 후 유세포분석용 PBS (Becton Dickinson)로 세포를 2번 세척하고 동일한 PBS 500 μ l를 첨가한 후 유세포분석기 (FACScan, Becton Dickinson)로 분석하였다.

<80> 세포표현형 분석을 위하여 단핵구 항원인 CD14 (BD sciences), 내피전구 항원인 CD31 (BD sciences), 백혈구 관련 항원인 CD45 (BD sciences), 조혈모세포 관련 항원인 CD34 (BD sciences), 중간엽 줄기세포 항원인 CD73 (BD sciences), CD105 (Ansell Co.), 세포부착 관련 항원인 CD166 (Ansell Co.)을 사용하였다.

<81> 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 단핵구로부터 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포는 CD14, CD31, CD45 항원에 대한 항체에는 양성반응을 나타내었고, CD34, CD73, CD105, CD166 항원에 대한 항체에는 음성반응을 나타내는 특징을 보였다.

<82> <실시예 3> 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포의 신경세포로의 분화 유도

<83> 본 발명에 따라 제대혈 유래 단핵구로부터 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포가 다양한 조직세포로 분화될 수 있는지 확인하기 위하여, 실시예 1에서 배양된 다분화능 전구/줄기세포를 4×10^4 세포/ cm^2 의 농도로 분화유도배지에 접종한 후 1 내지 2주간 배양하여 신경세포 분화를 유도하였다. 이때, 신경세포 분화 유도를 위해 사용한 배지는 1% FBS, $110 \mu\text{g}/\text{ml}$ 피루브산염 나트륨, 2 mM L-글루타민, $1 \times$ 페니실린/스트렙토마이신, $10 \mu\text{M}$ 레티노산, $10 \mu\text{M}$ 폴스콜린, $100 \text{ ng}/\text{ml}$ 신경 성장인자, 0.001% 베타-머캅토에탄올을 추가로 포함하는 HG-DMEM (Gibco BRL, cat. No. 12800-017)이다.

<84> 도 4는 본 발명의 방법에 따라 제대혈 유래 단핵구로부터 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포가 신경세포로 분화되는지를 현미경으로 관찰한 것으로, 이들이 신경돌기를 보이는 전형적인 신경세포 형태를 갖추고 있음을 확인하였다.

<85> 또한, 분자생물학적 검증방법으로 역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)을 실시하였다. 신경세포로의 분화를 유도한 후 1 내지 10×10^6 세포에 트리졸 (Trizol, Invitrogen Inc.) 1 ml을 5분간 처리하여 용해시키고 트리졸 1 ml당 클로로포름 $200 \mu\text{l}$ 를 처리하여 15,000 rpm의 속도로 15분간 원심분리하였다. 이로부터 RNA가 포함된 상층액을 분리하여 새 튜브에 옮긴 후 트리졸 1 ml당 이소프로판올 $500 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 RNA 침전을 유도하였다. 75% 냉각 에탄올로 RNA 펠렛을 세척하고 상온에서 건조시킨 후 DEPC가 포함된 3차 증류수에 적정 농도로 RNA를 용해시켜 역전사 반응의 주형으로 사용하였다.

<86> 먼저, 상기와 같이 준비된 RNA를 65°C 에 5분간 두어 2차 구조를 제거하였다. 역전사 반응용액은 $6 \times$ 역전사 효소 완충용액 $5 \mu\text{l}$, 2.5 mM dNTP $2 \mu\text{l}$, 올리고 d(T) 프라이머 ($500 \text{ ng}/\mu\text{l}$) $1 \mu\text{l}$, RNA 분해효소 억제제 $0.5 \mu\text{l}$, 주형 RNA $2 \mu\text{g}$ 및 역전사 효소 ($200 \text{ U}/\mu\text{l}$;

Promega) 1 μ l를 포함하며, DEPC 처리된 멸균 3차 증류수로 전체 반응부피를 30 μ l로 적정하였다. 역전사 반응은 42°C에서 90분간 반응시킨 후, 94°C에서 5분간 역전사 효소를 불활성화시켜 cDNA를 합성함으로써 이후 PCR에 사용될 주형 DNA를 제조하였다.

<87> PCR은 신경세포에서 특이적으로 발현한다고 알려진 유전자에 상보적인 서열로 이루어진 다음의 프라이머를 이용하여 수행하였다: 네스틴 (nestin) 유전자를 위한 서열번호 1 및 2의 프라이머 쌍; 뉴로필라멘트 (neurofilament) 유전자를 위한 서열번호 3 및 4의 프라이머 쌍; 비멘틴 (vimentin) 유전자를 위한 서열번호 5 및 6의 프라이머 쌍; 속스-1 (Sox-1) 유전자를 위한 서열번호 7 및 8의 프라이머 쌍; 속스-2 유전자를 위한 서열번호 9 및 10의 프라이머 쌍; 뉴로-D (Neuro-D) 유전자를 위한 서열번호 11 및 12의 프라이머 쌍; GFAP 유전자를 위한 서열번호 13 및 14의 프라이머 쌍; 및 GAPDH 유전자를 위한 서열번호 15 및 16의 프라이머 쌍.

<88> 반응튜브에 각 프라이머 (10 pmole) 1 μ l, 2.5 mM dNTP 혼합액 2 μ l, 10×Taq DNA 중합효소 완충용액 (염화마그네슘 포함) 2.5 μ l, 상기의 주형 cDNA 500 ng 및 Taq DNA 중합효소 (5 U/ μ l, 바이오퀵스트) 0.1 μ l를 첨가하고, 멸균된 3차 증류수로 전체 반응 부피를 25 μ l로 적정한 후 각 프라이머 쌍에 대한 반응조건에서 PCR을 실시하였다: 94°C에서 4분 동안의 최초 변성화반응; 94°C에서 1분, 52 내지 61°C에서 1분, 72°C에서 1분의 반응을 35회 반복; 및 72°C에서 7분의 최종 연장반응. 이때, 각각의 유전자에 대한 프라이머의 어닐링 온도는 네스틴 53°C, 비멘틴 52°C, 속스-1 54°C, 속스-2 53°C, 뉴로필라멘트 53°C, 뉴로-D 61°C 및 GFAP 52°C이다.

<89> 도 5 및 6은 RT-PCR을 통해 신경세포 표지 유전자의 발현을 확인한 것으로, 신경세포에서 특이적으로 발현하는 네스틴, 뉴로필라멘트, 비멘틴, 속스-1, 속스-2, 뉴로-D, GFAP 및 GAPDH 유전자가 본 발명의 제대혈 유래 줄기세포에서 분화 유도된 신경세포에서 검출됨을 확인하였다.

<90> <실시에 4> 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포의 골모세포로의 분화 유도

<91> 실시예 1에서 배양된 다분화능 전구/줄기세포에 0.05% 트립신-EDTA를 처리하여 배양용기로부터 분리하여 배지내에 부유시킨 후 6-웰 배양용기에 4×10^5 세포/웰의 농도로 접종하고 1주일 후, 10% BSA (Gibco), 100 U/ml 페니실린-100 $\mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신 (Gibco)이 포함된 HG-DMEM에 0.1 μM 덱사메타손, 100 μM 2-인산 아스코르브산 및 10 mM 베타-글리세로포스페이트를 처리한 골모세포 분화 유도배지를 각 웰에 첨가하여 2주간 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 배양하였다. 배지는 3 내지 4일에 한번씩 새로운 것으로 갈아주었고, 그때마다 시약을 처리하였다.

<92> 다분화능 전구/줄기세포의 골모세포로의 분화를 확인하기 위하여 골모세포를 특이적으로 염색하는 알칼라인 포스파타아제 (alkaline phosphatase, ALP) 염색시약을 사용하여 관찰하였다. 먼저, 웰로부터 배지를 제거하고 ALP 완충용액으로 세포를 세척하였다. 상기 웰에 염색시약 (1 mg/ml 나프톨 AS-TR 인산과 2 mg/ml 레드 바이올렛 (Fast red violet) LB를 10:1의 비율로 혼합한 것)을 각각 1 ml씩 첨가하고 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 염색시약을 제거하고 PBS로 3번 세척하였다. 각 웰에 100% 냉각 알코올을 1 ml씩 첨가하고 30분간 냉장 보관하여 세포를 고정시켰다. 고정 후 알코올을 제거하고 증류수로 2번 세척한 후 공기 중에서 건조시키고 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 본 발명의 제대혈 유래 골모세포에만 ALP가 염색되어 상기 방법에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 골모세포의 분화가 효과적으로 유도되었음을 확인하였다 (도 7 참조).

- <93> 또한, 분자생물학적 분석방법으로 RT-PCR을 실시하였는데, RNA 분리와 cDNA 합성은 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 수행하였다.
- <94> PCR은 골모세포에서 특이적으로 발현한다고 알려진 유전자에 상보적인 서열로 이루어진 다음의 프라이머를 이용하여 수행하였다: 알칼라인 포스파타아제 유전자를 위한 서열번호 17 및 18의 프라이머 쌍; 및 타입 I 프로콜라겐 (type I procollagen) 유전자를 위한 서열번호 19 및 20의 프라이머 쌍에 대한 반응조건에서 PCR을 실시하였다.
- <95> 반응튜브에 각 프라이머 (10 pmole) 1 μ l, 2.5 mM dNTP 혼합액 2 μ l, 10 \times Taq DNA 중합효소 완충용액 (염화마그네슘 포함) 2.5 μ l, 주형 cDNA 2 μ l 및 Taq DNA 중합효소 (5 U/ μ l, 바이오케스트) 0.1 μ l를 첨가하고 멸균된 3차 증류수로 전체 반응부피를 25 μ l로 적정한 후 각 프라이머 쌍에 대한 반응조건에서 PCR을 실시하였다: 94 $^{\circ}$ C에서 4분의 최초 변성화반응; 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 52 내지 61 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분의 반응을 35회 반복; 72 $^{\circ}$ C에서 7분의 최종 연장 반응. 이때, 각각의 유전자에 대한 프라이머의 어닐링 온도는 알칼라인 포스파타아제 46 $^{\circ}$ C, 타입 I 프로콜라겐 49 $^{\circ}$ C이다.
- <96> 그 결과, 골모세포에서 특이적으로 발현하는 알칼라인 포스파타아제 및 타입 I 프로콜라겐 유전자가 본 발명에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화 유도된 골모세포에서 검출됨을 확인하였다 (도 8 참조)
- <97> <실시예 5> 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 내피세포 분화 유도
- <98> 실시예 1에서 배양된 다분화능 전구/줄기세포에 0.05% 트립신/EDTA를 처리하여 배양용기로부터 분리하여 배지내로 부유시킨 후 6-웰 배양용기에 5×10^5 세포/웰의 농도로 접종하고 1주

일 후, 1% BSA (Gibco), 100 U/ml 페니실린-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신 (Gibco)이 포함된 HG-DMEM에 100 ng/ml VEGF를 처리한 내피세포 분화 유도배지를 각 웰에 첨가하고 2주일간 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 배양하였다. 배지는 3 내지 4일에 한번씩 새것으로 갈아주었고, 그때마다 시약을 처리하였다.

<99> 다분화능 전구/줄기세포의 내피세포로의 분화를 확인하기 위하여 ac-LDL 섭취능을 조사하였다. 먼저, 배양용기에서 배지를 제거하고 PBS로 웰에 부착되어있는 세포를 세척한 후 ac-LDL을 웰당 50 ng/ml의 농도로 처리하였다. 상기 웰을 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 4 시간 동안 반응시켰다. 반응 후 시약을 제거하고 PBS로 3번 세척하였다. 여기에, 4% 포르말린 시약을 웰당 1 ml씩 넣어서 30분간 고정한 후 형광현미경을 사용하여 ac-LDL 섭취능을 확인하였다. 그 결과, ac-LDL이 세포 내로 섭취되어, 대부분의 세포가 붉은 색으로 염색됨을 확인하였다 (도 9 참조).

<100> 또한, 분자생물학적 분석방법으로 RT-PCR을 실시하였는데, RNA 분리와 cDNA 합성은 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 수행하였다.

<101> PCR은 내피세포에서 특이적으로 발현한다고 알려진 유전자에 상보적인 서열로 이루어진 프라이머를 이용하여 수행하였다: Flt-1/VEGFR-1 유전자를 위한 서열번호 21 및 22의 프라이머 쌍; VE-캐드헤린 (cadherin) 유전자를 위한 서열번호 23 및 24의 프라이머 쌍; 및 vWF (von Willebrand factor) 유전자를 위한 서열번호 25 및 26의 프라이머 쌍.

<102> 반응튜브에 각 프라이머 (10 pmole) 1 μl , 2.5 mM dNTP 혼합액 2 μl , 10 \times Taq DNA 중합효소 완충용액 (염화마그네슘 포함) 2.5 μl , 주형 cDNA 2 μl 및 Taq DNA 중합효소 (5 U/ μl , 바이오퀵스트) 0.1 μl 를 첨가하고 멸균된 3차 증류수로 전체 반응부피를 25 μl 로 적정한 후 각 프라이머 쌍에 대한 반응조건에서 PCR을 실시하였다: 94°C에서 4분의 최초 변성화반응; 94°C에

서 1분, 56℃에서 1분, 72℃에서 1분의 반응을 35회 반복; 72℃에서 7분의 최종 연장반응. 이 때, 각 유전자에 대한 프라이머의 어닐링 온도는 모두 56℃이다.

<103> 그 결과, 골모세포에서 특이적으로 발현되는 Flt-1/VEGFR-1, VE-캐드헤린 및 vWF 유전자가 본 발명에 따라 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화 유도된 내피세포에서 검출됨을 확인하였다 (도 10 참조)

【발명의 효과】

<104> 상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 분리 및 배양방법에 의해서 제대혈 유래 단핵구로부터 다분화능 전구/줄기세포를 높은 생존도와 순도를 유지하면서 분리하여 대량으로 배양할 수 있으며, 분화 유도방법에 의해서는 상기와 같이 배양된 다분화능 전구/줄기세포를 신경세포, 골모세포, 내피세포 등과 같은 다양한 조직세포로 분화시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 방법에 의해 얻은 다분화능 전구/줄기세포 및 이로부터 분화된 조직세포는 생명체인 배아를 대상으로 하여 생명윤리 논란이 분분한 배아줄기세포를 대신하여 세포요법, 세포대체요법, 장기복원술, 장기생산 등에 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

제대혈 유래 단핵구를 통상적인 세포배양용 배지에 과립구-대식세포 콜로니 자극인자 (granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF)를 추가로 포함하는 1차 세포배양배지; 상기 1차 세포배양배지에서 GM-CSF가 결핍된 2차 세포배양배지; 및 통상적인 세포배양용 배지에 덱사메타손 (dexamethasone), 줄기세포인자 (stem cell factor; SCF), 염기성 섬유아세포 성장인자 (basic-fibroblast growth factor; bFGF) 및 상피세포 성장인자 (epidermal growth factor; EGF)를 추가로 포함하는 3차 세포배양배지에 순차적으로 단층 배양하는 단계를 포함하는, 제대혈 유래 단핵구로부터 다분화능 전구/줄기세포를 분리 및 배양하는 방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서,

통상적인 세포배양용 배지가 3,500 내지 5,500 mg/ml D-글루코오스와 50 내지 200 mg/ml 피루브산염 나트륨을 포함하는 고농도 포도당 (high glucose) 배지인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 3】

제 1항에 있어서,

1차 배양배지가 10 내지 20% 소 태아 혈청 (Fetal Bovine Serum, FBS), 0.5 내지 2 mM 피루브산염 나트륨 (sodium pyruvate), 1 내지 5 mM L-글루타민, 1×페니실린/스트렙토마이신 및 10 내지 100 ng/ml GM-CSF를 포함하고; 2차 배양배지가 10 내지 20% FBS, 0.5 내지 2 mM 피루브산염 나트륨, 1 내지 5 mM L-글루타민 및 1×페니실린/스트렙토마이신을 포함하고; 3차 배양배지가 10 내지 20% FBS, 0.5 내지 2 mM 피루브산염 나트륨, 1 내지 5 mM L-글루타민, 1×

페니실린/스트렙토마이신, 10^{-8} 내지 10^{-7} M 텍사메타손, 10 내지 100 mg/ml 줄기세포인자, 10 내지 50 mg/ml 염기성 섬유아세포 성장인자, 및 10 내지 50 mg/ml 상피세포 성장인자를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 4】

제 1항에 있어서,

1차 배양이 0.1 내지 1×10^6 세포/ cm^2 의 단핵구를 1차 배양배지에 접종하여 1 내지 2주간 5% 이산화탄소, 37°C 조건에서 이루어지고; 2차 배양이 콜로니 형성이 확인된 1차 배양 세포의 배지를 2차 배양배지로 바꾸어주고 1 내지 2주간 5% 이산화탄소, 37°C 조건에서 이루어지고; 3차 배양이 2차 배양된 세포를 인산염 완충용액으로 세척하고 트립신/EDTA 용액으로 처리한 후 2 내지 8×10^4 세포/ cm^2 의 세포를 3차 배양배지에 접종하여 1 내지 2주간 5% 이산화탄소, 37°C 조건에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 5】

제 1항의 방법에 의해 제대혈 유래 단핵구로부터 분리 및 배양된 다분화능 전구/줄기세포.

【청구항 6】

제 5항에 있어서,

CD14, CD31 및 CD45 항원에 대한 항체에는 양성반응을 나타내고, CD34, CD73, CD105 및 CD166 항원에 대한 항체에는 음성반응을 나타내는 면역표현형을 갖는 것을 특징으로 하는 다분화능 전구/줄기세포.

【청구항 7】

제대혈 유래 단핵구로부터 다분화능 전구/줄기세포를 분리 및 배양하기 위한, 하기 배지 조성물들로 구성된 군으로부터 선택되는 배지 조성물: 10 내지 20% 소 태아 혈청 (Fetal Bovine Serum; FBS), 0.5 내지 2 mM 피루브산염 나트륨 (sodium pyruvate), 1 내지 5 mM L-글루타민, 1×페니실린/스트렙토마이신 및 10 내지 100 ng/ml GM-CSF를 포함하는 세포배양용 배지 조성물;

10 내지 20% FBS, 0.5 내지 2 mM 피루브산염 나트륨, 1 내지 5 mM L-글루타민 및 1×페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 세포배양용 배지 조성물; 및

10 내지 20% FBS, 0.5 내지 2 mM 피루브산염 나트륨, 1 내지 5 mM L-글루타민, 1×페니실린/스트렙토마이신, 10^{-8} 내지 10^{-7} M 덱사메타손, 10 내지 100 mg/ml 줄기세포인자, 10 내지 50 mg/ml 염기성 섬유아세포 성장인자, 및 10 내지 50 mg/ml 상피세포 성장인자를 포함하는 세포배양용 배지 조성물.

【청구항 8】

제 5항의 다분화능 전구/줄기세포를 0.1 내지 2% FBS, 0.5 내지 2 mM 피루브산염 나트륨, 1 내지 5 mM L-글루타민, 1×페니실린/스트렙토마이신, 1 내지 25 μ M 레티노산 (retinoic acid), 1 내지 20 μ M 폴스콜린 (Folskolin), 10 내지 100 ng/ml 신경 성장인자 (nerve growth factor; NGF) 및 0.00001 내지 0.0001% 베타-머캅토에탄올 (beta-mercaptoethanol)을 포함하는 세포배양용 배지에 접종하여 배양하는 단계를 포함하는, 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법.

【청구항 9】

제 8항에 있어서,

다분화능 전구/줄기세포를 0.1 내지 2×10^6 세포/ cm^2 농도로 배지에 접종하여 5% 이산화탄소, 37℃ 조건에서 1 내지 2주간 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 10】

제 8항의 방법에 의해 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화되고, 네스틴, 뉴로필라멘트, 비멘틴, 속스-1, 속스-2, 뉴로-D, GFAP 및 GAPDH 유전자가 특이적으로 발현되는 신경세포.

【청구항 11】

제 5항의 다분화능 전구/줄기세포를 5 내지 20% FBS, $1 \times$ 페니실린/스트렙토마이신, 0.1 내지 $1 \mu\text{M}$ 텍사메타손, 10 내지 $100 \mu\text{M}$ 2-인산 아스코르브산 및 5 내지 20 mM 베타-글리세로포스페이트를 포함하는 세포배양용 배지에 접종하여 배양하는 단계를 포함하는, 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포를 골모세포로 분화시키는 방법.

【청구항 12】

제 11항에 있어서,

다분화능 전구/줄기세포를 0.5 내지 2×10^5 세포/ cm^2 농도로 배지에 접종하여 5% 이산화탄소, 37℃ 조건에서 1 내지 2주간 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 13】

제 11항의 방법에 의해 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화되고, 알칼라인 포스파타아제 및 타입 I 프로콜라겐 유전자가 특이적으로 발현되는 골모세포.

【청구항 14】

제 5항의 다분화능 전구/줄기세포를 0.1 내지 2% FBS 및 1×페니실린/스트렙토마이신 및 10 내지 100 ng/ml VEGF를 포함하는 세포배양용 배지에 접종하여 배양하는 단계를 포함하는, 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포를 내피세포로 분화시키는 방법.

【청구항 15】

제 14항에 있어서,

다분화능 전구/줄기세포를 0.2 내지 0.4×10^5 세포/cm²의 농도로 접종하여 5% 이산화탄소, 37℃ 조건에서 1 내지 2주간 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 16】

제 14항의 방법에 의해 제대혈 유래 다분화능 전구/줄기세포로부터 분화되고, Flt-1/VEGFR-1, VE-캐드헤린 및 vWF 유전자가 특이적으로 발현되는 내피세포.

【청구항 17】

제 5항의 다분화능 전구/줄기세포, 제 10항의 신경세포, 제 13항의 골모세포 및 제 16항의 내피세포로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 유효성분으로 함유하는 세포요법용 조성물.

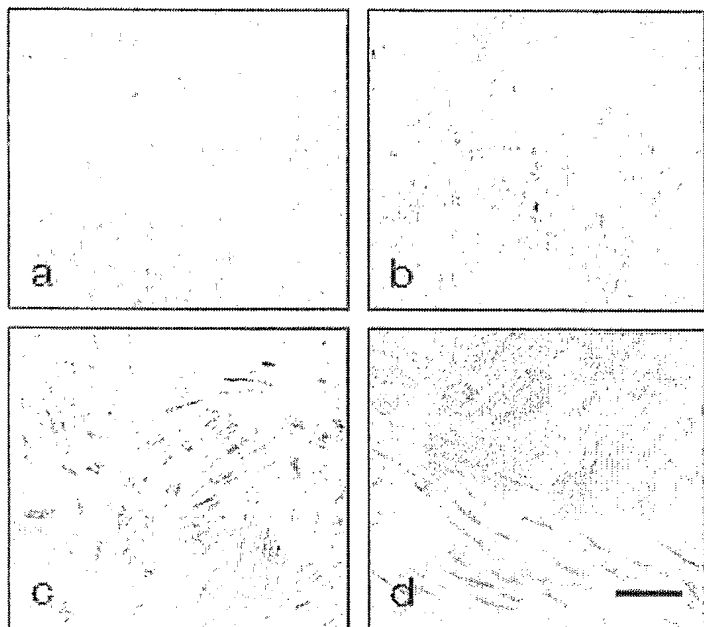
【청구항 18】

제 17항에 있어서,

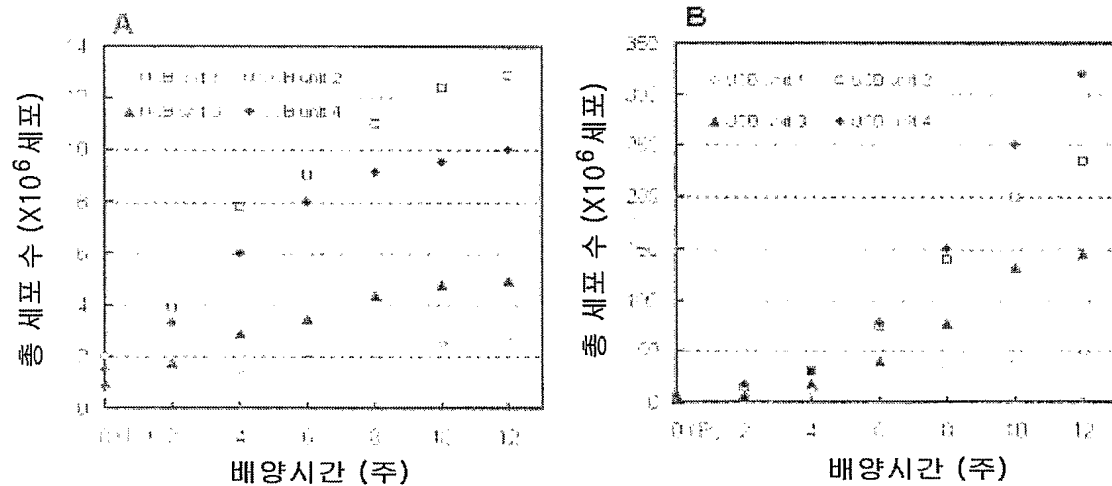
뇌졸중, 척수질환, 파킨슨씨병, 알츠하이머병, 간질 및 뇌종양의 난치성 중추신경계 질환, 근육질환, 심장근질환, 간질환, 당뇨병, 혈액질환, 골세포 및 연골세포 치료와 손상된 조직의 재생공학적 치료에 사용되는 것을 특징으로 하는 조성물.

【도면】

【도 1】

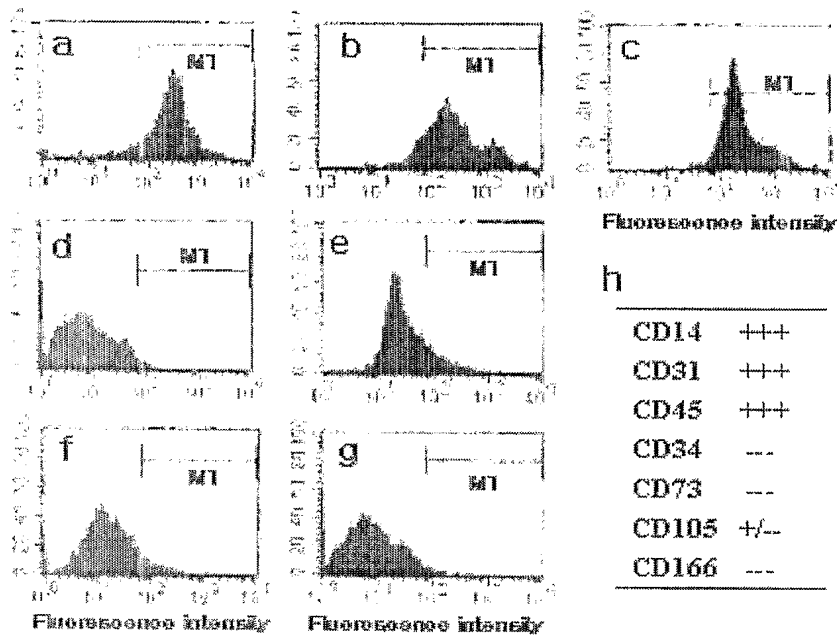


【도 2】

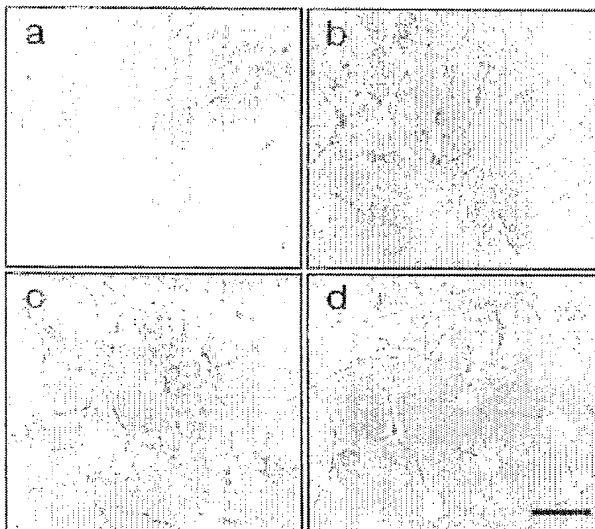




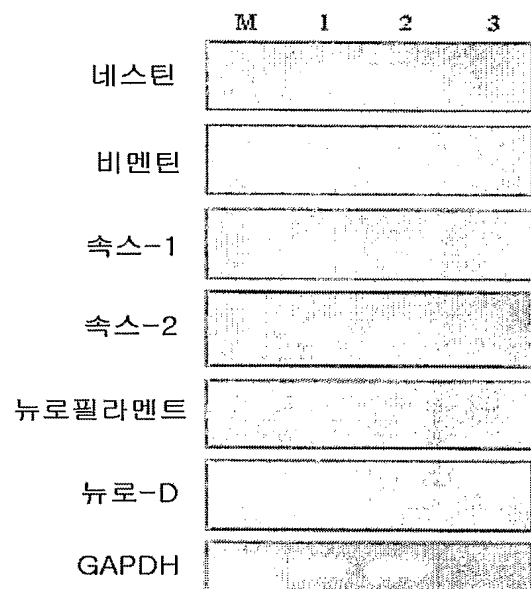
【도 3】



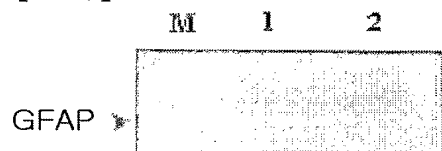
【도 4】



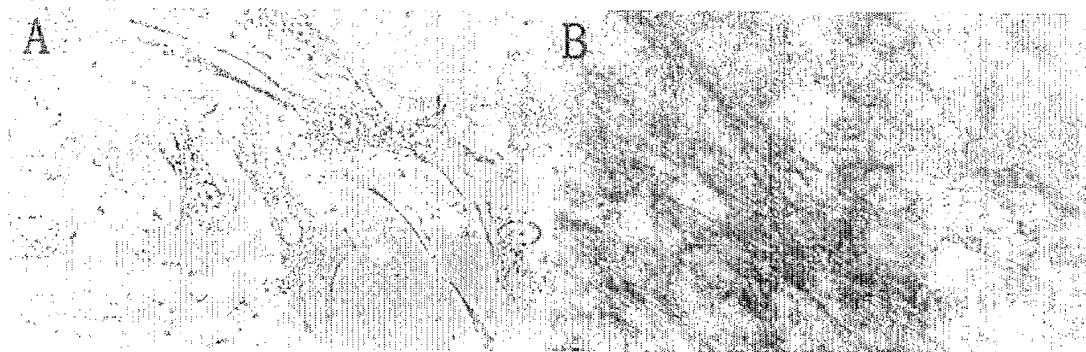
【도 5】



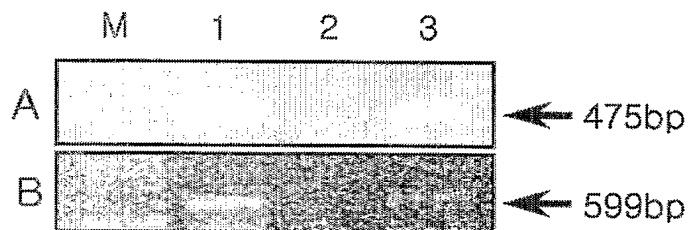
【도 6】



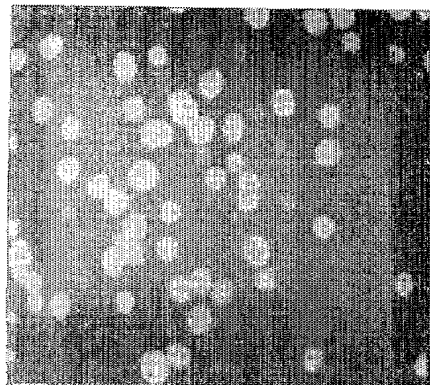
【도 7】



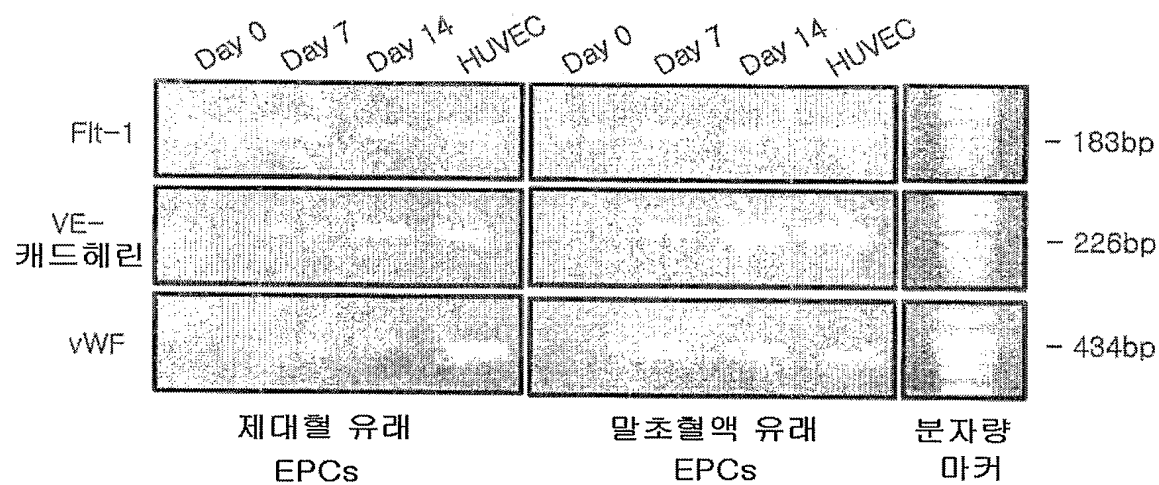
【도 8】



【도 9】



【도 10】



【서열목록】

서열목록 전자파일 첨부

